

피부면역계 랑게르한스세포의 TNF- α 생산에 대한 Pedunculagin의 효과

주성수 · 오원식 · 박정환 · 이도익

중앙대학교 약학대학

(Received October 30, 2002; Received December 3, 2002)

Effect of Pedunculagin in production of TNF- α of Langerhans Cells

Seong Soo Joo, Won Sik Oh, Jeong Hwan Park and Do Ik Lee[#]

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract — Ellagitannins have been reported to enhance the immune system. In this study, the effects of pedunculagin on langerhans cells were examined. Pedunculagin, an ellagitannin from *Alnus hirsuta* var. *microphylla*, *Betulaceae*, is a novel immunomodulator. Langerhans cell are known as the potent antigen presenting cell and elicit the Contact Hypersensitivity (CHS) response by presenting Ag to trafficking Ag-specific T cells within the skin. For determining the effects of pedunculagin on murine langerhans cell, the expression of TNF- α mRNA was examined by RT-PCR. As a result, the expression of TNF- α mRNA was upregulated by pedunculagin. These results suggest that pedunculagin enhances TNF- α and could be used as an immunomodulator in skin immune system.

Keywords □ Ellagitannin, pedunculagin, immunomodulator

최근 들어 새로운 개념으로서의 새로운 치료요법을 시도하려는 노력들이 많이 이루어지고 있다. 이러한 새로운 요법으로 각광받는 것 중의 하나가 면역요법(immunotherapy)이며, 면역세포를 활성화시켜 면역력을 증가시키는 방법이 그 중 하나이다. 표피내의 Langerhans Cell(LC)은 극히 적은 cell수에도 불구하고 강력한 antigen presenting cell(APCs)로서 피부 면역 반응에서 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁻⁶⁾ 세포 매개성 면역 반응의 결과로 알려진 Contact Hypersensitivity(CHS)에 있어서도 antigen(Ag)을 제공함으로써 Ag-specific T cells 을 자극하여 반응을 매개하는 것으로 알려져 있다.^{7,8)}

Masue H, *et al.*, Daniel N. Sauder, *et al.* 을 포함한 여러 연구자들의 논문에 따르면 LC는 IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , MIP-1 α 등의 cytokine을 분비하는 것으로 알려지고 있다.⁹⁻¹¹⁾ TNF- α 는 다른 cytokines(IL-1 β , IL-6, GM-CSF)의 분비를 증가시킬 뿐만 아니라 monocyte를 활성화시키고 fibroblast에 작용하여 fibrosis와 염증반응에 관여하는 것으로 보고 되고 있다.¹²⁾

본 연구자의 실험에서는 중앙대학교 약학대학 생약학교실에서

제공받은 천연물질 pedunculagin을 가하였을 때 murine langerhans cell에서 분비되는 TNF- α 의 발현의 변화를 조사하여 pedunculagin이 피부 면역계에서 immunomodulator로서의 가능성 여부를 관찰하였다.

실험방법

Animal – 본 연구에 사용된 실험 동물은 5~6주령의 BALB/c계 mouse로 한림 실험 동물에서 구입하여 실험하였다.

Pedunculagin – 본 연구에 사용한 Pedunculagin(C₃₄H₂₄C₂₂ M.W.=784.55)은 오리나무(*Alnus hirsuta* var. *microphylla*, *Betulaceae*)에서 정제한 ellagitannin으로 중앙대학교 약학대학 생약학 교실에서 제공받아 사용하였다. 본 연구에서 투여한 pedunculagin은 RPMI 용액에 넣어 완전히 용해시킨 후 0.22 μ m filter로 여과 멸균하여 사용하였다.

Reagents – BSA(Sigma Chem. Co., U.S.A), FBS(Gibco BRL, U.S.A), Ficoll(Pharmacia, U.S.A.) Gentamycin(Gibco BRL, U.S.A), HBSS(Sigma Chem. Co., U.S.A), Nylon wool (Wako, Japan), Penicillin-streptomycin(Gibco BRL, U.S.A), RPMI 1640(Sigma Chem. Co., U.S.A), Trypsin(Gibco BRL, U.S.A)

Instruments – Centrifuge(Vision sci. co., Korea), Clean

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-820-5608 (팩스) 02-822-1469
(E-mail) leedi@cau.ac.kr

bench(Vision sci. co., Korea), CO₂ incubator(Vision sci. co., Korea), Deep freezer(Sanyo, Japan), Microscope(Olympus), Electronic balance(Meter toledo, Swizerland), pH meter (Meter toledo, Swizerland), Autoclave(Vision sci. co., Korea)

Preparation of cell suspension - Epidermal cell 의 single cell suspension 제조는 standard protocols에 따라 실시하였다.^{13,14)} 먼저, 제 1 부유액(Hank solution, trypsin, antibiotics) 과 제 2 부유액(Hank solution, FCS, gentamycin)을 조제하였다. Mouse를 급사시켜 귀를 잘라낸 뒤 70% ethanol로 소독하였다. 이를 두 조각으로 나누어 미리 준비해 둔 제 1 부유액에서 약 30 분 동안 37°C incubation 시켰다. Incubation 후 표피를 진피로부터 분리하고 제 2 부유액에서 incubation하였다. 이들을 Plastic tube에 옮겨 vortex를 하고 분리되지 않은 조직 편은 nylon wool로 제거하였다. 제조된 cell suspension은 800 g에서 10분 동안 원심분리하고 10% FBS-RPMI 1640으로 2-3회 washing하였다.

Preparation of langerhans cell enriched epidermal cell - 준비된 cell suspension을 37°C, 5% CO₂에서 72시간 동안 incubation한 후 pipetting에 의해 회수되었다. 고속원심분리 용 plastic tube에 4 ml의 Ficoll액을 넣고 그 위에 4 ml의 10% FBS-RPMI 1640을 액면이 혼란하지 않게 천천히 떨어뜨렸다. 원심 분리후 생긴 Ficoll과 배양액 층과의 사이에 있는 저밀도 세포를 pasteur pipette으로 회수하고, 과량의 RPMI를 가하여 교반 한 후, 원심 분리하여 세포를 washing하여 그 일부를 취해 세포 수를 계측하였다.

In Vitro experiments - Pedunculagin은 배지에 1, 10, 100 µg/ml의 농도로 녹여 사용하였다. Langerhans cell에 대한 pedunculagin의 효과를 알아보기 위하여 2개의 실험 군으로 나누어 standard protocols에 따라 실험하였다.¹⁵⁾

한 실험 군은 1, 10, 100 µg/ml 농도의 pedunculagin을 투여한 뒤 4, 8, 12, 24시간 동안 배양하였다. 또 다른 실험 군은 10 µg/ml의 PMA(phorbol myristate acetate)로 10분 동안 자극, 활성화시킨 뒤 1, 10, 100 µg/ml의 농도의 pedunculagin을 투여하여 4, 8, 12, 24시간 동안 배양하였다. TNF-α의 발현 변화는 RT-PCR을 통하여 확인하였다.

In Vivo experiments - Pedunculagin은 배지에 1, 5, 10 mg/kg의 농도로 녹여 사용하였다. Contact allergen, DNFB는 acetone/olive oil (4:1)에 녹여 0.5% DNFB 500 µg/kg로 준비하였다.¹⁵⁾ Langerhans cell에 대한 pedunculagin의 효과를 알아보기 위하여 2개의 실험 군으로 나누어 실험하였다.

한 실험 군은 1, 5, 10 mg/kg의 농도의 pedunculagin을 mouse의 귀에 바르고 4, 8, 12, 24시간 후 langerhans cell suspension을 제조하였다. 또 다른 실험 군은 0.5% DNFB(2, 4-dinitrofluorobenzene) 500 µg/kg로 자극, 활성화시킨 뒤 1, 5, 10 mg/kg pedunculagin을 바르고 역시 4. 8. 12. 24시간 후

langerhans cell suspension을 제조하여 그 결과를 조사하였다. TNF-α의 발현 변화는 RT-PCR을 통하여 확인하였다.

RNA extraction - Pharmacia biotech.의 instruction에 따라 total RNA를 extraction하였다. 세포에 LiCl 용액 350 µl, β-mercaptoethanol 3 µl, extraction buffer 150 µl, CsTFA 500 µl를 가하여 vortex하여 세포를 lysis 시켰다. 15,000 rpm에서 15 분간 원심 분리 후 total RNA를 얻었다. 취해진 total RNA를 세척하기 위하여 extraction buffer 75 µl, LiCl 용액 175 µl, CsTFA 250 µl를 가하여 세척한 후에 70% ethanol을 제거한 후 실온에서 15분간 건조 시켰다. Total RNA에 DEPC-treated water 50 µl를 가하여 얼음에 15-30분간 방치한 후 vortex하고 65°C에서 10분간 가열하였다. vortex 한 후 -20°C에 보관하였다.

RNA analysis (OD analysis) - 얻은 RNA의 농도는 spectrophotometer를 통하여 260 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아래 계산방법으로 total RNA농도를 계산한 후 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)에 사용할 total RNA 1 µg을 정량 하였다.

$$[RNA] = OD_{260} \text{ nm} \times D \times 40 \text{ } \mu\text{g/ml} \text{ (D=final dilution factor)}$$

Reverse transcription and Polymerase chain reaction - 1 µg의 total RNA를 reverse transcription에 사용하였다. 20U의 Moloney Murind Leukimia virus reverse transcriptase, 10U의 RNasin, 1U의 thermostable DNA polymerase, dNTP를 함유하는 20 µl 용 RT-PCR kit을 사용하였다. RT-PCR은 Bioneer의 protocol에 따라 수행하였다. RNA 1µg, oligo(dT)₁₈ 25pmole, primer 50pmol, RNase-free water로 20 µl까지 채우고 reverse transcription을 수행하였고, 42°C에서 60분 동안 incubation하여 cDNA를 합성하였다, 94°C에서 5분 동안 가열하여 reverse transcriptase inactivation한 후 4°C에서 incubation 하였으며, PCR 증폭은 94°C 0.5분, 55°C 1.5분, 68°C 1분, 34 cycles로 반응시켰다. 3 µl의 PCR product를 1.8% agarose gel에서 loading 하였다.

실험결과

In Vitro - Pedunculagin 1, 10, 100 µg/ml를 가한 후 4, 8, 12, 24 시간 배양한 후에 total mRNA 를 추출하여 RT-PCR 에 의하여 분석하였다. Pedunculagin 투여 후 4, 8시간동안은 baseline과 비교했을 때 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 그러나 12시간 후 pedunculagin 100 µg/ml에서 뚜렷한 증가를 보였고 100 µg/ml pedunculagin에 의해서는 24시간 후에도 지속적인 증가를 나타내었다(Fig. 1).

10 ng/ml PMA로 자극하고 pedunculagin 1, 10, 100 µg/ml를 가하였을 때 처음 4시간동안은 baseline과 비교했을 때 별다른

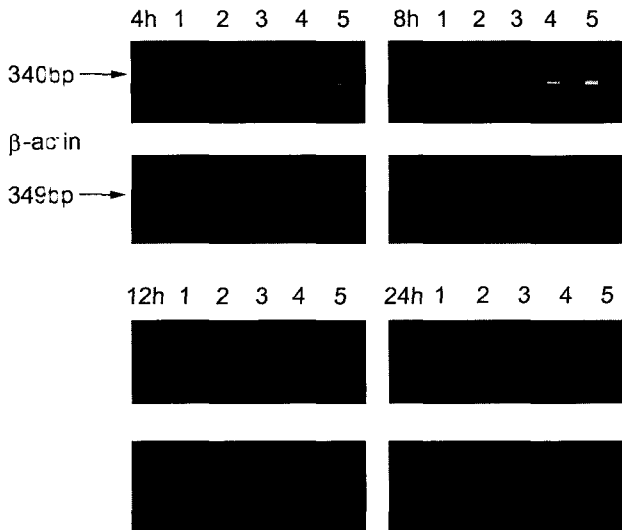


Fig. 1 - Effect of pedunculagin on the induction of TNF- α mRNA in murine langerhans cell *in vitro*. Total RNA extracted from murine langerhans cells were analyzed by RT-PCR 4, 8, 12, 24h after application 1, 10, 100 μ g/ml pedunculagin. 1: Base signal, 2: Pedunculagin 1 μ g/ml, 3: Pedunculagin 10 μ g/ml, 4: Pedunculagin 100 μ g/ml, 5: PMA 10 ng/ml.

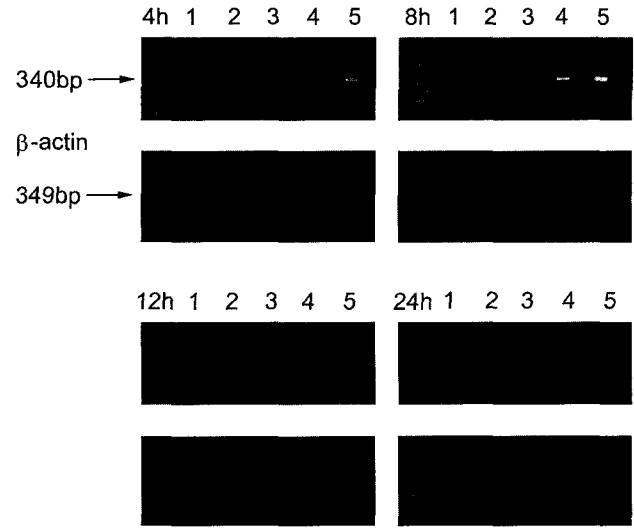


Fig. 3 - Effect of pedunculagin on the induction of TNF- α mRNA in murine langerhans cell *in vivo*. Total RNA extracted from murine langerhans cells were analyzed by RT-PCR 4, 8, 12, 24h after application 1, 5, 10 mg/kg pedunculagin. 1: Base signal, 2: Pedunculagin 1 mg/kg, 3: Pedunculagin 5 mg/kg, 4: Pedunculagin 10 mg/kg, 5: DNFB 500 mg/kg.

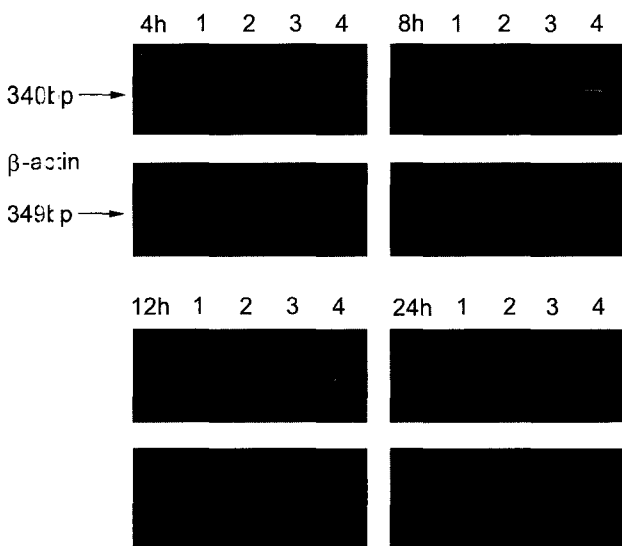


Fig. 2 - Effect of pedunculagin on the induction of TNF- α mRNA after PMA stimulation in murine langerhans cell *in vitro*. After 10 ng/ml of PMA stimulation for 10 min, murine langerhans cells were treated with 1, 10, 100 μ g/ml of pedunculagin. Total RNA extracted from murine langerhans cells were analyzed by RT-PCR 4, 8, 12, 24h after application 1, 10, 100 μ g/ml pedunculagin. 1: PMA 10 ng/ml treatment, 2: PMA 10 ng/ml + Pedunculagin 1 μ g/ml, 3: PMA 10 ng/ml + Pedunculagin 10 μ g/ml, 4: PMA 10 ng/ml + Pedunculagin 100 μ g/ml.

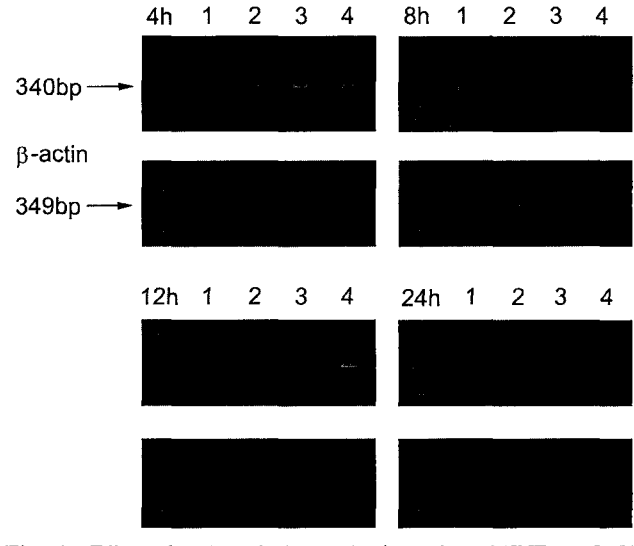


Fig. 4 - Effect of pedunculagin on the induction of TNF- α mRNA after DNFB sensitization in murine langerhans cell *in vivo*. After DNFB 500 μ g/kg sensitization, murine langerhans cells were treated with 1, 5, 10 mg/kg of pedunculagin. Total RNA extracted from murine langerhans cells were analyzed by RT-PCR 4, 8, 12, 24h after application 1, 5, 10 mg/kg pedunculagin. 1: DNFB 500 μ g/kg treatment, 2: DNFB 500 μ g/kg + Pedunculagin 1 mg/kg, 3: DNFB 500 μ g/kg + Pedunculagin 5 mg/kg, 4: DNFB 500 μ g/kg + Pedunculagin 10 mg/kg.

변화가 나타나지 않았다. 그러나 8시간부터 TNF- α mRNA 발현 증가를 보이고 100 μ g/ml의 경우에는 12, 24 시간 동안 배양 후

에도 발현증가는 계속되었다(Fig. 2).

In Vivo- Mouse의 귀에 1, 5, 10 mg/kg pedunculagin을 바르고 각각 4, 8, 12, 24시간 뒤 langerhans cell suspension을 준

비하여 그 영향을 조사하였다. 4시간 후 IL-1 β mRNA 발현은 별 다른 변화가 없었고 8, 12시간에서는 10 mg/kg pedunculagin에 의한 TNF- α mRNA 발현 증가가 관찰되었고 24시간에서도 TNF- α mRNA 발현증가가 관찰되었다(Fig. 3).

CHS에 대한 pedunculagin을 알아보기 위해 contact allergen, DNFB를 사용하였다. 0.5% DNFB 500 μ g/kg을 도포 한 뒤 1, 5, 10 mg/kg pedunculagin을 바르고 각각 4, 8, 12, 24시간 후 langerhans cell suspension을 제조하여 그 영향을 조사하였다. 4, 8시간까지 발현에 별다른 변화를 보이지 않다가 10 mg/kg의 경우 12, 24시간 배양 후에는 TNF- α mRNA 발현 증가가 관찰되었다(Fig. 4).

고 찰

본 실험의 결과는 langerhans cell에서 TNF- α mRNA 발현을 조사한 것이다. Langerhans cell은 표피 내에 극소수 존재함에도 불구하고 피부 면역 반응에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. CHS와 같은 반응에서 antigen을 T-cell에 제공함으로써 반응을 매개하는 역할을 한다고 보고된 바 있다. Matsue H, et al., Daniel N. Sauder, et al.^{9,11)} 등을 포함한 여러 연구자들의 논문에 따르면 LC는 IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , MIP-1 α 등의 cytokine을 분비하는 것으로 알려지고 있다. TNF- α 는 다른 cytokines(IL-1 β , IL-6, GM-CSF)의 분비를 증가시킬 뿐 아니라 monocyte를 활성화시키고 fibroblast에 작용 fibrosis와 염증반응에 관여하는 것으로 보고 되어 지고 있으며, 또한 Saitoh A, et al.¹²⁾ 에 따르면 LC가 표피로부터 이동하는데 있어 부분적으로 관여하고 있다고 보고되었다.

현재까지 tannin이 langerhans cell에서 cytokine을 유도했다는 보고는 거의 없었으며, tannin이 면역증강작용이 있다는 것은 보고되었으나 mechanism을 규명하지 못하였다는 점에서 이 실험이 의미를 가진다고 하겠다. 이 실험으로 mechanism을 규명하는데 한계가 있으나, mechanism 규명의 기초 자료가 될 수 있을 것이다.

본 실험에서는 *in vitro*, *in vivo*에서 LC를 pedunculagin 1, 10, 100 μ g/ml로 처리하여 TNF- α mRNA 유도를 시간과 용량별로 측정하였다. Positive control로 *in vitro*에서는 PMA를 사용하였고 *in vivo*에서는 DNFB를 사용하였다. Murine LC를 취하여 pedunculagin 1, 10, 100 μ g/ml 또는 1, 5, 10 mg/kg을 가한 후 4, 8, 12, 24시간 배양하고 total mRNA를 추출하여 RT-PCR에 의하여 분석하였다. 그 결과, *in vitro*에서 TNF- α 는 pedunculagin 1 μ g/ml 투여 군 모두 4, 8, 12, 24시간 후에 baseline과 비교하여 큰 증감을 나타내지 않았다. 그러나, pedunculagin 10, 100 μ g/ml 과 5, 10 mg/kg투여군의 경우 증가를 나타내었다. 10, 100 μ g/ml과 5, 10 mg/kg pedunculagin으로

처리했을 때 8시간 배양부터 TNF- α mRNA의 발현 증가가 관찰되었다. 100 μ g/ml 과 10 mg/kg pedunculagin 경우 그 영향력이 지속되어 24시간 배양 후에도 TNF- α mRNA의 발현 증가가 관찰되었고 positive control인 PMA¹⁷⁾와 DNFB¹⁶⁾에서도 유사한 형태의 발현을 보였다. CHS와 같은 피부의 negative immune response에서의 pedunculagin의 영향을 알아보기 위해서 *in vivo*에서는 contact allergen, DNFB가 *in vitro*에서는 PMA가 사용되었다. *In vivo*에서 0.5% 500 μ g/kg의 DNFB를 도포한 뒤 1, 5, 10 mg/kg pedunculagin을 바르고 각각 4, 8, 12, 24시간 후 langerhans cell suspension을 제조하여 그 영향을 조사하였다. 4, 8시간 때에는 baseline과 비슷하게 발현되었고, 12, 24시간에는 10 mg/kg pedunculagin에 의한 발현 증가를 나타내었다. *In vitro*에서도 유사한 결과가 나타났다. 그리고 PMA와 DNFB 모두 24시간까지 발현을 보였으나 8, 12 시간에서 가장 강한 발현을 보이며 점차 반응이 약해졌다. 이는 PMA와 DNFB의 지속시간을 보여주는 것으로 생각된다.

본 실험을 종합해 보면 pedunculagin 1 μ g/ml 투여 군 모두 4, 8, 12, 24시간 후에 baseline과 비교하여 큰 증감을 나타내지 않았다. 또한 100 μ g/ml 과 10 mg/kg 같이 고농도에서 발현변화가 뚜렷한 것으로 나타났다. 이 같은 결과로 볼 때 pedunculagin 1 μ g/ml은 TNF- α mRNA의 발현에 영향을 미치는데 충분치 못한 양이며 pedunculagin이 용량 의존성 효과를 가지고 있다고 할 수 있을 것이다. *In vitro*, *In vivo*에서 pedunculagin에 의한 TNF- α 발현 증가로 인해 monocytes가 활성화되고 다른 cytokines(IL-1 β , IL-6, GM-CSF)등의 분비증가를 가져올 것으로 생각되어진다. 또한 TNF- α 발현 증가는 fibroblast에 영향을 끼쳐 fibrosis, 염증반응이 나타날 수 있을 것이라고 추측되어진다. 이와 같은 결과는 pedunculagin의 새로운 면역증강물질로서의 가능성을 제시하고 있다고 생각된다.

문 헌

- 1) Peeler J. S. and Niederkorn J. Y. : Antigen presentation by Langerhans cells in vivo: donor-derived Ia+ Langerhans cells are required for induction of delayed-type hypersensitivity but not for cytotoxic T lymphocyte responses to alloantigens. *J. Immunol.* **136**, 4362 (1986).
- 2) Balfour B. M., Drexhage H. A., Kamperdijk E. W. and Hoefsmit E. C. : Antigen-presenting cells, including Langerhans cells, veiled cells and interdigitating cells. *Ciba. Found. Symp.* **84**, 281 (1981).
- 3) Bjercke S., Braathen L., Gaudernack G. and Thorsby E. : Relative efficiency of human Langerhans' cells and blood derived dendritic cells as antigen-presenting cells. *Acta. Derm. Venereol.* **65**, 374 (1985).

- 4) Girolomoni G., Valle M. T., Zacchi V., Costa M. G., Giannetti A. and Manca F. : Cultured human Langerhans' cells are superior to fresh cells at presenting native HIV-1 protein antigens to specific CD4+ T-cell lines. *Immunology*, **87**, 310 (1996).
- 5) Bjerkce S., Elgo J., Braathen L. and Thorsby E. : Enriched epidermal Langerhans cells are potent antigen-presenting cells for T cells. *J. Invest. Dermatol.*, **83**, 286 (1984).
- 6) Camberbatch M., Gould S. J., Peters S. W. and Kimber I. : MHC class II expression by Langerhans' cells and lymph node dendritic cells: possible evidence for maturation of Langerhans' cells following contact sensitization. *Immunology*, **74**, 414 (1991).
- 7) Hogan A. D., Burks A. W. : Epidermal Langerhans cells and their function in the skin immune system. *Ann. Allerg. Asthma. Immunol.* **75**, 5 (1995).
- 8) Braathen L. R. and Thorsby E. : Human epidermal Langerhans cells are more potent than blood monocytes in inducing some antigen-specific T-cell responses. *Br. J. Dermatol.*, **108**, 139 (1983).
- 9) Matsue H., Cruz P. D. Jr., Bergstresser P. R. and Takashima A. : Langerhans cells are the major source of mRNA for IL-1 beta and MIP-1 alpha among unstimulated mouse epidermal cells. *J. Invest. Dermatol.* **99**, 537 (1992).
- 10) Camberbatch M., Dearman R.J. and Kimber I. : Constitutive and inducible expression of interleukin-6 by Langerhans cells and lymph node dendritic cells. *Immunology*. **87**, 513 (1996).
- 11) Sauder D. N., Dinarello C. A. and Morhenn V. B. : Langerhans cell production of interleukin-1. *J. Invest. Dermatol.*, **82**, 605 (1984).
- 12) Saitoh A., Yasaka N., Osada A., Nakamura K., Furue M. and Tamaki K. : Migration of Langerhans cells in an *in vitro* organ culture system: IL-6 and TNF-alpha are partially responsible for migration into the epidermis. *J. Dermatol. Sci.* **19**, 166 (1999).
- 13) Tamaki K., Stingl G., Gullino M., Sachs D. H. and Katz S. I. : Ia Antigen in mouse skin are predominantly expressed on langerhans cells. *J. immuno.* **123**, 784 (1979).
- 14) Sullivan S., Bergstresser P. R., Tigelaar R. E. and Streilein J. W. : FACS purification of bone marrow-derived epidermal population in mice: Langerhans cells and Thy-1+ dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* **84**, 491 (1985).
- 15) Streilein J. W., Toews G. T., Gilliam J. N., Bergstresser P. R. : Tolerance or hypersensitivity to 2,4-dinitro-1-fluorobenzene: the role of Langerhans cell density within epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **74**, 319 (1980).
- 16) Feng Y. H., Zhou W. L., Wu Q. L., Li X. Y., Zhao W. M. and Zou J. P. : Low dose of resveratrol enhanced immune response of mice. *Acta Pharmacol Sin.* **23**, 893 (2002).
- 17) Qiu M. R., Campbell T. J. and Breit S. N. : A potassium ion channel is involved in cytokine production by activated human macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* **130**, 67 (2002).